

1. Streszczenie w języku polskim

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) to grupa heterogennych zaburzeń neurorozwojowych dotykających około 1% światowej populacji. Osoby z ASD mają trudności w komunikacji społecznej oraz wykazują powtarzalne wzorce zachowań. Etiologia ASD jest złożona i obejmuje zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Prenatalna ekspozycja na leki, np. walproinian sodu, jest jednym z czynników ryzyka. Podłoże genetyczne można zidentyfikować u 10-30% osób z ASD; większość związanych z nim genów wpływa na strukturę i funkcję synaps oraz szlaki sygnalizacji neuronalnej. Jednym z najczęstszych zaburzeń jednogenowych powiązanych z ASD jest stwardnienie guzowate (TSC), spowodowane mutacją genów *TSC1* lub *TSC2*, które hamują aktywność kinazy mTOR. U 26-50% pacjentów z TSC występują objawy behawioralne charakterystyczne dla ASD. Szlak mTOR reguluje translację i biosyntezę białek oraz autofagię; jego zaburzenia mogą prowadzić do nieprawidłowości w ekspresji białek synaptycznych oraz receptorów, co może powodować objawy ASD.

Sygnalizacja purynergiczna, zależna od zewnątrzkomórkowych nukleotydów, odgrywa kluczową rolę w regulacji struktury i funkcji synaps. W ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), ATP i adenozyne są uwalniane z komórek neuronalnych i glejowych, zarówno w sposób regulowany, jak i niekontrolowany. ATP w szczelinie synaptycznej ulega degradacji przez ektonukleotydazy, kontrolując ilość biodostępnych agonistów aktywujących receptory purynergiczne (P1 dla adenozyne i P2 dla nukleotydów). Przekaznictwo purynergiczne pośredniczy w komunikacji komórek OUN, regulując aktywację mikrogleju i uwalnianie cytokin prozapalnych. Ponadto, ATP może wzmacniać sygnalizację związaną z kinazą mTOR.

Do chwili obecnej nie ma kompleksowej analizy interakcji pomiędzy zaburzeniami sygnalizacji purynergicznej, szlakiem mTOR i poziomem białek synaptycznych w ASD. Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie udziału deregulacji przekaznictwa purynergicznego w zależnych od mTOR zmianach kluczowych białek synaptycznych i rozwoju zachowań typowych dla ASD. Badania prowadzone były z wykorzystaniem dwóch modeli zaburzeń ze spektrum autyzmu: środowiskowego, gdzie ASD indukowane były prenatalną ekspozycją na kwas walproinowy (VPA) i genetycznego, u myszy z częściowym wyciszeniem genu *Tsc2*.

Otrzymane wyniki pokazują, że prenatalna ekspozycja na VPA prowadzi do deregulacji sygnalizacji purynergicznej już na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, w fazie formowania się połączeń synaptycznych. W mózgu zwierząt w 19. dniu embrionalnym wykryto

wzrost sygnalizacji zależnej od adenozyliny oraz zaburzenie homeostazy wapniowej wynikające z nadekspresji kanałów jonowych P2X2/P2X3 i obniżenia poziomu receptorów P2Y1 i P2Y12, co może przyczyniać się do wytworzenia nieprawidłowości neuroanatomicznych w mózgu w okresie postnatalnym. W hipokampie 52-dniowych zwierząt VPA zaobserwowano wzrost poziomu receptora P2X1 przy jednoczesnym spadku ekspresji P2X7 i P2Y1. Natomiast w korze mózgowej poziom P2X1 był znacząco obniżony. W tej strukturze zaobserwowano również znaczny wzrost poziomu receptorów P2Y1 i P2Y12. Powyższe zmiany mogą skutkować upośledzeniem zdolności poznawczych, zaburzeniami w regulacji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego oraz aktywacją procesów zapalnych. Prenatalna ekspozycja na VPA wpływa nie tylko na ekspresję wybranych podtypów receptorów purynergicznych, ale wywołuje zmiany procesów odpowiedzialnych za regulację poziomu zewnątrzkomórkowych nukleotydów. W korze, hipokampie i mózdzku zwierząt badanych zaobserwowano wzrost ekspresji białek zaangażowanych w uwalnianie ATP oraz zwiększenie poziomu ATP, ADP i AMP w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Obserwowane zaburzenia przekaźnictwa purynergicznego wpływają na aktywację mikrogleju w korze mózgowej i wzrost ekspresji cytokin: Tnf α i IL-6 oraz powodują aktywację szlaku kinazy mTOR. Badania prowadzone na modelu myszy z częściowym wyciszeniem genu *Tsc2* wykazały, że nadmierna aktywacja mTOR prowadzi do zmian anatomicznych mózgu, zaburzenia struktury synaps oraz szeregu innych nieprawidłowości ultrastrukturalnych w komórkach OUN. Ponadto, u zwierząt transgenicznych zaobserwowano zmiany poziomu kluczowych białek synaptycznych odpowiedzialnych za regulację procesu synaptogenezy oraz homeostazę pęcherzyków synaptycznych. Zastosowanie antagonistów receptorów P2 w modelu VPA normalizowało zmiany w ekspresji białek synaptycznych oraz zapobiegało zmianom behawioralnym, takim jak nadmierna lękliwość, występowanie zachowań repetytywnego oraz zmniejszenie aktywności eksploracyjnej.

2. Streszczenie w języku angielskim

Autism Spectrum Disorders (ASD) are a group of heterogeneous neurodevelopmental disorders affecting approximately 1% of the global population. Individuals with ASD have difficulties with social communication and exhibit repetitive behavior. The etiology of ASD is complex, involving both environmental and genetic factors. Prenatal exposure to drugs, such as valproic acid, is one of the risk factors for ASD. Genetic background can be identified in 10-30% of autistic individuals, with most associated genes influencing the structure and function of synapses and neuronal signaling pathways.

One of the most common monogenic disorders associated with ASD is the tuberous sclerosis complex (TSC), caused by mutations in the *TSC1* or *TSC2* genes, which inhibit the activity of the mTOR kinase. In 26-50% of TSC patients, behavioral symptoms characteristic of ASD are present. The mTOR pathway regulates translation, protein biosynthesis, and autophagy; its dysregulation can lead to abnormalities in the expression of synaptic proteins and receptors, potentially causing ASD symptoms.

Purinergic signaling, dependent on extracellular nucleotides, plays a crucial role in regulating the structure and function of synapses. In the central nervous system (CNS), ATP and adenosine are released from neuronal and glial cells both in a regulated and uncontrolled manner. Synaptic ATP is degraded by ectonucleotidases, controlling the amount of bioavailable agonists that activate purinergic receptors (P1 for adenosine and P2 for nucleotides). Purinergic signaling mediates communication between CNS cells, regulating microglial activation and the release of pro-inflammatory cytokines. Additionally, ATP can enhance mTOR pathway signaling.

There has been no comprehensive analysis of the interactions between purinergic signaling dysregulation, the mTOR pathway, and synaptic protein levels in ASD. Therefore, this doctoral dissertation aimed to investigate the involvement of purinergic signaling deregulation in mTOR-dependent alterations of key synaptic proteins and the development of ASD-like behaviors. The research was conducted using two ASD models: an environmental model, where ASD was induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA), and a genetic model with *Tsc2* gene knockdown mice.

The results indicate that prenatal exposure to VPA leads to purinergic signaling dysregulation during synapse formation occurring at an early embryonic development. In the brains of embryos at day 19, an increase in adenosine-dependent signaling and calcium homeostasis disruption was detected due to overexpression of P2X2/P2X3 ion channels and

decreased levels of P2Y1 and P2Y12 receptors. This may contribute to neuroanatomical abnormalities in the postnatal brain. In the hippocampus of 52-day-old VPA animals, an increase in P2X1 receptor levels was observed alongside a decrease in P2X7 and P2Y1 expression. Conversely, P2X1 levels in the cortex were significantly reduced, with a significant increase in P2Y1 and P2Y12 receptors. These changes may impair cognitive abilities, disrupt long-term synaptic potentiation regulation, and activate inflammatory processes.

Prenatal VPA exposure affects not only the expression of specific purinergic receptor subtypes but also processes regulating extracellular nucleotide levels. In the cortex, hippocampus, and cerebellum of experimental animals, an increase in proteins involved in ATP release and elevated levels of ATP, ADP, and AMP in cerebrospinal fluid were observed.

Purinergic signaling disturbances affect microglial activation in the cortex and increase expression of cytokines: $Tnf\alpha$ and IL-6, leading to mTOR pathway activation. Studies in *Tsc2* knockdown mice indicated that excessive mTOR activation results in brain anatomical changes, synapse structure disruption, and other ultrastructural abnormalities in CNS cells. Additionally, transgenic animals showed altered levels of key synaptic proteins responsible for regulating synaptogenesis and synaptic vesicle homeostasis. P2 receptor antagonists normalized changes in synaptic protein expression and prevented behavioral alterations such as excessive anxiety, repetitive behavior, and reduced exploratory activity in the VPA animal model.